

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Kvantitativní analýza D2 dopaminergních receptorů u klinicky afunkčních  
adenomů hypofýzy**

**Filip Gabalec**

**Autoreferát dizertační práce**

**Doktorský studijní program Vnitřní nemoci**

**Hradec Králové**

**2012**

Dizertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Vnitřní nemoci na Katedře interních oborů Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Filip Gabalec, 2. Interní klinika – Oddělení klinické hematologie a endokrinologie, LF UK a FN Hradec Králové

Školitel: Prof. MUDr. Jan Čáp, CSc., 2. Interní klinika – Oddělení klinické hematologie a endokrinologie, LF UK a FN Hradec Králové

Školitel konzultant: Doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D. – Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

Oponenti: prof. MUDr. Václav Hána, CSc. - 3. interní klinika 1. LFUK a VFN, Praha  
doc. MUDr. Zdeněk Fryšák, CSc. - 3. interní klinika - nefrologická, revmatologická a endokrinologická, Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc

Obhajoba dizertační práce se bude konat před Komisí pro obhajobu dizertačních prací doktorského studijního programu Vnitřní nemoci dne .....

Tato práce vznikla za podpory grantu *GAUK 79008 a IGA NT 11344-4/2010*.

S dizertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.  
Předseda komise pro obhajobu dizertačních prací  
v doktorském studijním programu Vnitřní nemoci.

## Obsah

1	Souhrn .....	4
2	Summary .....	5
3	Úvod do problematiky .....	6
4	Cíle dizertační práce .....	7
5	Metodika a pacienti.....	7
6	Výsledky .....	9
6.1	Imunohistochemická charakteristika .....	9
6.2	Expres mRNA dopaminového D2 receptoru .....	9
6.3	Vztah exprese D2R a patologické klasifikace KAA .....	11
6.4	Expres mRNA somatostatinových receptorů podtyp SSTR2, SSTR3 a SSTR5.....	11
6.5	Porovnání exprese D2R a SSTR 2, 3 a 5 .....	14
7	Diskuse.....	15
8	Závěry .....	18
9	Použitá literatura.....	19
10	Přehled publikační činnosti autora.....	23

# 1 Souhrn

## *Úvod*

Klinicky afunkční adenomy hypofýzy představují asi jednu třetinu všech hypofyzárních tumorů. Většina z nich je patologem klasifikována jako gonadotropinomy nebo null-cell adenomy bez imunohistochemické positivity hormonální sekrece. Zbytek tvoří tiché kortikotropní adenomy a tiché plurihormonální tumory. Konzervativní léčba dopaminovými agonisty je účinná pouze v některých případech v závislosti na expresi dopaminových D2 receptorů (D2R).

## *Cíle*

Hlavním cílem projektu bylo zavést a optimalizovat kvantitativní analýzu D2 dopaminového receptoru pomocí real-time RT-PCR u nemocných operovaných pro KAA do laboratorní praxe ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Dále jsme chtěli kvantitativně určit expresi D2 podtypu dopaminového receptoru v sérii klinicky afunkčních adenomů a korelovat výsledky exprese D2 dopaminového receptoru s patologickou klasifikací adenomu dle imunohistochemického vyšetření.

## *Metodika a výsledky*

Z 87 vyšetřovaných adenomů 63 exprimovalo gonadotropiny, 7 adenomů byly tiché kortikotropní adenomy, 7 plurihormonální tumory a 6 neexprimovalo žádný hypofyzární hormon při imunohistochemickém vyšetření. Při použití real-time RT-PCR byla D2R mRNA exprimována ve všech adenomech ve velmi různorodé kvantitě. Exprese D2R mRNA byla velmi nízká v kortikotropních adenomech (relativní medián kvantity po normalizaci na housekeepingový gen 0,01) a nižší v plurihormonálních adenomech (medián 0,4) než v gonadotropních adenomech (medián 1,3) a null-cell adenomech (medián 1,9). Rozdíl mezi kortikotropními adenomy oproti ostatním typům byl statisticky významný. Exprese D2R nezávisela na přítomnosti gonadotropinů.

Variabilní byla i exprese SSTR2,3 a 5. SSTR5 byl přítomen jen v 40 % adenomů oproti SSTR2 a 3, které byly exprimovány ve všech adenomech. Exprese D2R byla oproti SSTR2,3 a 5 signifikantně vyšší u gonadotropních adenomů. U tichých kortikotropních adenomů pak byla exprese D2R nižší oproti SSTR2. Nebyla nalezena korelace mezi D2R a somatostatinovými receptory.

## *Závěry*

Exprese dopaminového D2 receptoru je velmi nízká v silentních kortikotropních adenomech a signifikantně nižší v plurihormonálních tumorech. Imunohistochemická pozitivita gonadotropinů nepředpovídá kvantitu D2R. Exprese SSTR2 a 3 se neliší dle histologického typu. SSTR5 je více exprimován v kortikotropních adenomech. Mezi expresí SSTR a D2R není korelace, koreluje mezi sebou pouze exprese SSTR2 a 3. Velmi heterogenní exprese dopaminových i somatostatinových receptorů může být důvodem proč experimentální použití analog těchto receptorů event. dopastatinů není klinicky efektivní u většiny klinicky afunkčních adenomů.

*Klíčová slova:* klinicky afunkční adenomy, dopaminový receptor, somatostatinový receptor

## 2 Summary

### Quantitative analysis of D2 dopamine receptors in clinically non-functioning pituitary adenomas

#### *Introduction*

Clinically non-functioning pituitary adenomas account for about one-third of pituitary tumors. The majority of them are pathologically classified as gonadotropinomas or null-cell adenomas without hormonal expression. The rest represent silent corticotroph adenomas and plurihormonal tumors. Conservative therapy with dopamine agonists is effective in some cases only depending on the expression of dopamine 2 receptors (D2R).

#### *Objective*

The aim of this study was to quantitatively estimate D2R expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas and correlate the results with adenoma type according to pathological classification.

#### *Methods and results*

Out of the 87 adenomas investigated, 63 expressed gonadotropins, 7 were silent corticotroph adenomas, 7 were plurihormonal tumors, and only 6 did not express any pituitary hormone on immunohistochemical investigation. With the use of the reverse transcriptase real-time PCR technique, D2R mRNA was expressed in all adenomas with very heterogeneous quantity. The expression was very low in corticotroph adenomas (relative median quantity after normalization to housekeeping gene 0.01) and lower in plurihormonal tumors (median 0.4) than in gonadotroph (median 1.3) and null-cell adenomas (median 1.9). The difference between corticotroph adenomas and plurihormonal tumors in comparison with other pathological types was statistically significant. The expression of D2R did not depend on the presence or absence of gonadotropins.

Expression of SSTR2, 3 and 5 mRNA was also very heterogeneous. SSTR5 was present only in 40 % of adenomas, SSTR 2 a 3 were present in all of them. D2R expression was statistically higher than SSTR2, 3 a 5 expression in gonadotrophs. However in D2R expression was significantly lower than SSTR2 expression in silent corticotrophs. There was no correlation between D2R and somatostatin receptors.

#### *Conclusions*

We conclude that D2R expression is very low in corticotroph adenomas and significantly lower in plurihormonal tumors. The positivity of gonadotropins does not predict the D2R quantity. Expression of SSTR2 and 3 is same in all histopathological types, expression of SSTR5 is higher in silent corticotroph adenomas. There is no correlation between D2R and somatostatin receptors, only expression of SSTR2 and 3 correlated. Very heterogeneous expression of dopamine and somatostatin receptors may be the reason why experimental use of dopamine and somatostatin analogs and „dopastatins“ is not clinically effective in the majority of CNFAs.

Key words: clinically non-functioning pituitary adenoma, dopamine receptor, somatostatin receptor

### 3 Úvod do problematiky

Dizertační práce představuje příspěvek k lepšímu pochopení role dopaminových receptorů a jejich roli v medikamentózní léčbě klinicky afunkčních adenomů. Nemocní s klinicky afunkčními adenomy tvoří velkou část mezi hypofyzárními tumory. Etiologie a patogeneze tohoto onemocnění není stále zcela objasněna. Primární léčebnou metodou je jednoznačně transsfenoidální neurochirurgický výkon, ten má však své limity a nevede ve většině případů k úplnému odstranění tumoru. Otázkou tedy zůstává zajištění nemocného po operaci. Radioterapie? Sledování? Medikamentózní léčba? Každá z variant má své klady a zápory. I přes velmi přesvědčivé možnosti medikamentózního ovlivnění prolaktinomů a akromegalie nevidíme stejné výsledky u klinicky afunkčních adenomů. Medikamentózní léčba je cestou ovlivnění receptorů jejich analogy. Dopaminový agonisté a chimérická analoga pro somatostatinový a dopaminový receptor – dopastatiny působí cestou dopaminových receptorů, rozhodli jsme se proto stanovit dopaminové receptory kvantitativně.

Dopaminové receptory jsou kódovány 5 oddělenými geny pro dopaminový receptor 1 až 5. Podtyp 2 dopaminového receptoru existuje ve 2 variantách – dlouhé a krátké, které se tvoří alternativním sestřihem. V normální lidské hypofýze je exprimován hlavně dopaminový receptor 2 a 5, s predominancí typu D2R. D3R není přítomen a exprese D1R a D4R je nízká.<sup>1</sup> Důvodem, proč jsme se zaměřili na expresi D2R v naší práci, je nejvyšší exprese mezi dopaminovými receptory v lidské hypofýze a jeho úloha v léčbě dopaminovými agonisty.

Nověji jsme rozšířili náš výzkum o somatostatinové receptory. SSTR jsou kódovány 5 oddělenými geny pro somatostatinový receptor 1–5,<sup>2</sup> z toho SSTR2 má podtyp A a B a SSTR5 existuje u hypofyzárních adenomů v pozmeněné formě obsahující menší počet transmembránových domén (SSTR5-TMD4 a SSTR5-TMD5). SSTR1 a SSTR4 je u KAA velmi nízká. Dominuje exprese SSTR2 a SSTR3.<sup>3</sup> Dalším z důvodů hodnocené exprese SSTR2,3 a 5 bylo, že v současné době jsou v klinické praxi dostupná analoga pro SSTR2 a SSTR5, užívaná hlavně v léčbě neuroendokrinních tumorů a akromegalie.

## 4 Cíle dizertační práce

Zavést a optimalizovat kvantitativní analýzu D2 dopaminového receptoru pomocí real-time RT-PCR u nemocných operovaných pro KAA do laboratorní praxe ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

Kvantitativně určit expresi D2 podtypu dopaminového receptoru ve velké sérii klinicky afunkčních adenomů.

Korelovat výsledky exprese D2 dopaminového receptoru s patologickou klasifikací adenomu dle imunohistochemického vyšetření.

## 5 Metodika a pacienti

Diagnóza KAA byla založena na vyloučení hormonální hypersekrece pomocí laboratorních testů a potvrzena histologickým vyšetřením po operaci. Celkem 87 pacientů s KAA bylo zahrnuto do analýzy. Šlo o nemocné operované na Neurochirurgické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Ústřední vojenské nemocnice Praha – Střešovice a nemocné z Neurochirurgické kliniky Lékařské fakulty univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Až na 3 nemocné podstoupili všichni pacienti operaci transsfenoidálním přístupem. Z celkového počtu pacientů s KAA bylo 55 mužů a 32 žen, ve věku 17 až 84 let (průměr  $\pm$  standardní odchylka  $59,4 \pm 14,3$ , medián 62,5 roku).

Všechny tumory byly makroadenomy v největším rozměru od 11 do 42 mm (průměr  $\pm$  standardní odchylka  $24 \pm 7$  mm, medián 24 mm). Hlavní indikací k operaci byla porucha zraku, bitemporální hemianopsie – 47 případů (54 %), diplopie s ohledem na nervovou obrnu – 16 případů (18 %), progresse nebo růst tumoru na MRI – 27 případů (31 %) a bolesti hlavy u 6 (7 %) nemocných. Panhypopituitarismus byl předoperačně prokázán u 25 (29 %) pacientů a vyžadoval substituci tyroxinem a hydrokortisonem. U 2 pacientů byl přítomen diabetes insipidus. Z celkového počtu 32 žen bylo 29 menopauzálních a tyto nebyly léčeny hormonální substitucí. 2 z 3 premenopauzálních žen byly léčeny substitucí estrogeny pro projevy hypogonadismu. Hypogonadismus byl zjištěn také u 26 mužů z 55. U 14 z nich bylo přistoupeno k substituci testosteronem předoperačně.

Tkáň vyjmutá při operaci byla vyšetřována standardním způsobem popisovaným v literatuře.<sup>4</sup> Část tkáně odoperovaného adenomu byla bezprostředně fixována v 10 %

formalínu, zpracována běžnou technikou a následně zafixována v parafínu. Řezy 5  $\mu\text{m}$  tlusté byly obarveny hematoxylin-eozinem a Goldbergovým trichromem. Gömöriho stříbření bylo použito k obarvení vaziva. Další řezy byly použity k imunohistochemickému vyšetření. Vyšetřovali jsme tyto hormony: ACTH; GH; prolaktin a specifické  $\beta$ -podjednotky dimerických glykoproteinů TSH, FSH, LH, a jejich společnou  $\alpha$ -podjednotku. Dále byla použita avidin-biotin technika a diaminobenzidinové barvení. Expres jednotlivých hormonů byla hodnocena semikvantitativně ve 4 stupních: 0 – absolutně negativní, 1 – lehká pozitivita v méně jak 15 % buněk, 2 – pozitivita v 15 – 70 % buněk, a 3 – silná pozitivita ve více jak 70 % buněk.

Ke kvantifikaci mRNA byla použita část tumorózní tkáně, do velikosti cca 5 mm, získaná během transsfenoidální operace. Tato tkáň byla po odběru vložena do RNAlateru (Quiagen) pro udržení stability RNA a zamražena dle protokolu výrobce a uchovávána při  $-80^{\circ}\text{C}$  až do analýzy. Zbývající část resekovaného tumoru byla podrobena standardnímu histologickému a imunohistochemickému vyšetření. Po rozmražení tkáně byla tato homogenizována v MagnaLyseru v "MagnaLyser green Beads" (obojí Roche Diagnostics) a poté provedena izolace celkové RNA pomocí Trizolu (Invitrogen). Čistota a kvantita takto získané RNA byla měřena přímou spektrofotometrií pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 (Thermo-Scientific). Posléze byla provedena v dubletu reverzní transkripce (Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix, Invitrogen) koncentračně optimalizované RNA. Část získané cDNA byla uchována pro další analýzu a 5  $\mu\text{l}$  bylo použito pro real-time PCR kvantifikaci (RotorGene 6000, Corbett) pomocí hydrolytických sond (TIB MolBiol). Reakční mix (25  $\mu\text{l}$ ) pro real-time PCR kvantifikaci obsahoval 12.5  $\mu\text{l}$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM každého primeru, 200 nM sonda a 5  $\mu\text{l}$  cDNA. Pro reakci byly použity primery pro D2 receptor od firmy GeneriBiotech, CZ. Sonda i primery byly již dříve publikovány<sup>5</sup> a obsahují nukleotidové sekvence krátké i dlouhé isoformy D2R. 50 cyklů PCR složených z 15 s denaturace při  $95^{\circ}\text{C}$  a 60 s annealingu a elongace při  $60^{\circ}\text{C}$  bylo provedeno na přístroji Rotor-Gene 6000, Corbett. Všechna vyšetření byla provedena v dubletu. Standardní křivka pro kvantifikaci RNA D2R byla vytvořena postupným naředěním TOPO plasmidového vektoru obsahujícího zaklonovanou nukleotidovou sekvenci D2R (Generi Biotech). S ohledem na degradační procesy postihující nukleové kyseliny byla kvantita RNA následně normalizována vůči  $\beta$  glucuronidase (GUS) housekeepingovému genu (Ipsogene). Analýza somatostatinových receptorů byla provedena z již získané zamražené cDNA připravené pro analýzu D2R. Měření již nebyla prováděna v dubletu. Pro analýzu byly použity sekvence publikované již v práci Taboady a spol.<sup>3</sup>



## 6 Výsledky

### 6.1 Imunohistochemická charakteristika

Tabulka Rozdělení adenomů dle imunohistologické klasifikace

Typ adenomu	Počet	%
Nezařazen/nedostatek materiálu	4	
Null-cell	6	7,2
Gonadotropní	63	75,9
Tiché kortikotropy	7	8,4
Plurihormonální	7	8,4

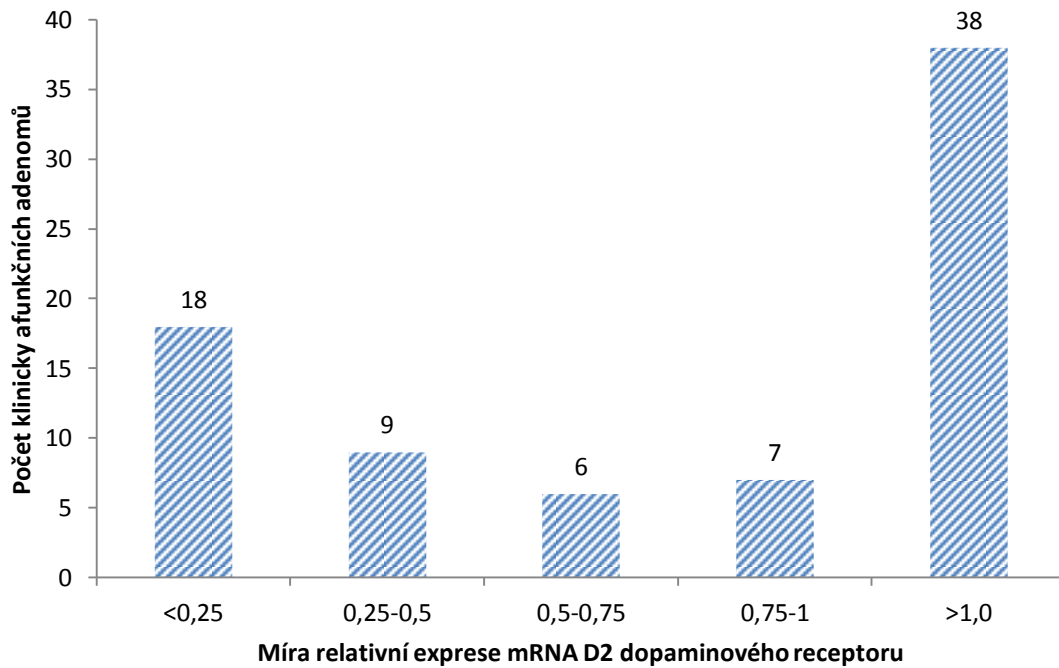
Tabulka Imunohistochemický profil plurihormonálních adenomů

Číslo histologie	Imunohistochemické vyšetření							
	ACTH	STH	PRL	$\alpha$ -podjednotka	LH	FSH	TSH	Ki-67 (%)
H303/09	+	-	+	++	+	+	+	1,0
5752/07	-	-	+	++	+	-	-	<0,5
1624/08	+	-	-	-	+	++	-	<0,5
7304/06	-	+++	++	++	-	-	++	<0,5
2700/08	-	-	+	+	+	+	+	<0,5
930/09	+	-	-	++	++	++	+	<0,5
H706/08	++	-	++	+	-	-	-	ND

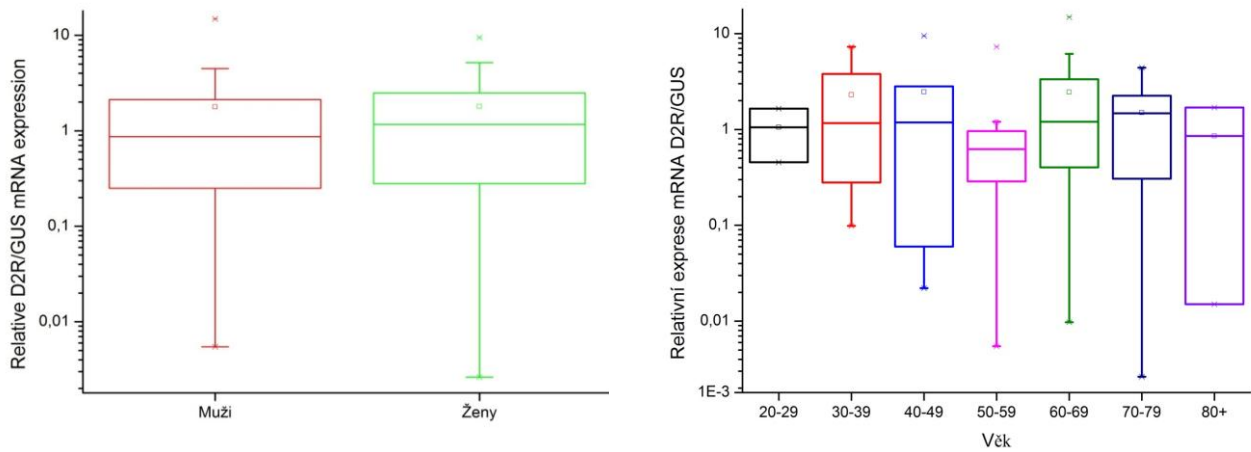
### 6.2 Expres mRNA dopaminového D2 receptoru

5 z 87 vzorků KAA exprimovalo méně než 100 kopií/5 $\mu$ l cDNA housekeepingového genu, pravděpodobnost, že tedy jde o tkáň hypofýzy je malá, proto byly z další analýzy vyřazeny. Všechny 78 hodnocených KAA exprimovalo mRNA D2R. Byla přítomna vysoká variabilita míry exprese mRNA D2R (graf č. 1). Absolutní hodnota míry exprese mRNA D2R se pohybovala od 0,93 do 1 689 137 kopií/ 5 $\mu$ l cDNA. Relativně (po normalizaci na housekeepingový gen GUS) pak od 0,003 do 14,86. Nebyl statisticky významný rozdíl v expresi mRNA D2R mezi pohlavími (Mann-Whitney,  $P=0,374$ , graf 2) ani při rozdělení nemocných dle věku (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks,  $P=0,757$ , graf 3). Stejně tak nebyl statisticky významný rozdíl v expresi D2R s ohledem na místo šíření adenomu (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks,  $P=0,678$ ).

**Graf 1** Počty klinicky afunkčních adenomů rozdělené do skupin dle míry relativní exprese mRNA D2R vůči housekeepingovému genu GUS.



**Graf 2 a 3** Relativní míra exprese mRNA D2R normalizovaná vůči GUS genu v klinicky afunkčních adenomech rozdělená dle pohlaví (vlevo) a dle věku (vpravo).

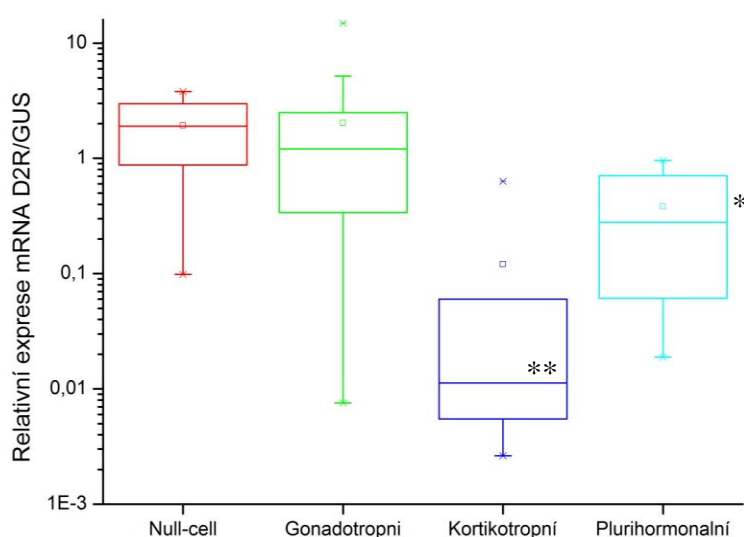


Nebyl patrný statisticky významný rozdíl v míře exprese mRNA dopaminového D2 receptoru mezi pohlavími ani dle věku.

### 6.3 Vztah exprese D2R a patologické klasifikace KAA

Expres D2R byla velmi nízká u všech tichých kortikotropních adenomů (medián relativní exprese 0,01). V ostatních typech adenomů byl medián relativní exprese 0,4 u plurihormonálních adenomů, 1,3 u gonadotropinů a 1,9 u null-cell adenomů. Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy a ostatními typy KAA byl statisticky významný při použití Mann-Whitneyova testu ( $p=0.003$ ). U plurihormonálních tumorů byla rovněž nalezena nižší exprese D2R než v null-cell a gonadotropních adenomech ( $p=0.036$  při použití Mann-Whitneyova testu). Avšak po vyloučení adenomů s expresí ACTH nebyl pozorován žádný rozdíl vůči ostatním typům.

**Graf 4** Relativní exprese mRNA normalizovaná vůči GUS v jednotlivých typech KAA rozdělených dle imunohistochemické positivity hormonů



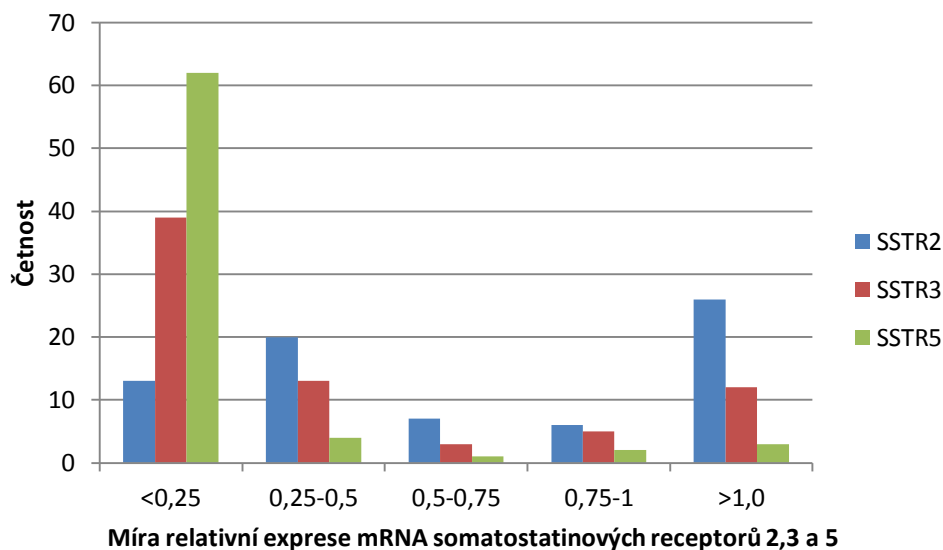
Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy a ostatními typy byl statisticky významný ( $p=0.003$ ). V plurihormonálních adenomech byla nižší exprese D2R než v null-cell a gonadotropních adenomech ( $p=0.036$ ). Statisticky signifikantní rozdíl: \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$

### 6.4 Expres mRNA somatostatinových receptorů podtyp SSTR2, SSTR3 a SSTR5

Všech 78 hodnocených KAA exprimovalo mRNA pro SSTR2 a SSTR3. Naopak SSTR5 nebyl přítomen ve 33 adenomech (42 %). Absolutní hodnota míry exprese mRNA SSTR2 byla v kvantitě 1174,8–146 680,8 kopií/5 $\mu$ l cDNA, SSTR3 62,9–46 914,3 a SSTR5 0–43 776,6 kopií/5 $\mu$ l cDNA. Relativně po normalizaci na housekeepingový gen GUS pak 0,05–105,69 pro SSTR2, 0,002–12,26 pro SSTR3 a 0,10–25,33 pro SSTR5. Byla rovněž přítomna

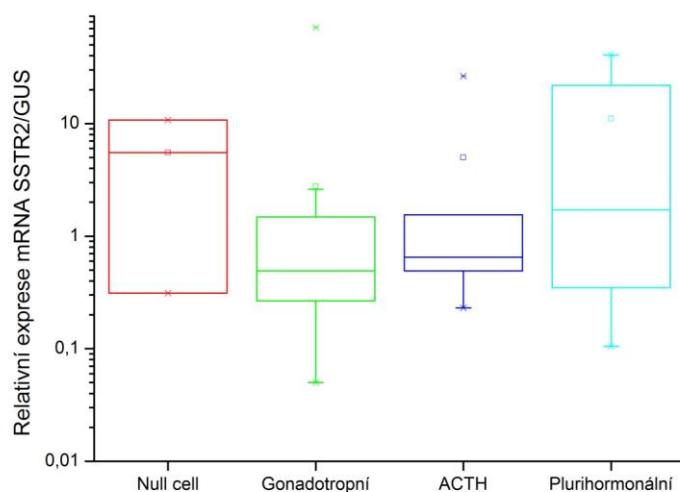
vysoká variabilita míry exprese mRNA pro somatostatinový receptor 2 a 3 (graf č. 5). Nebyl statisticky významný rozdíl v expresi mRNA SSTR mezi pohlavími ani při rozdělení nemocných dle věku. Při hodnocení míry exprese u všech klinicky afunkčních adenomů bez rozdílu imunohistochemické pozitivita byla exprese SSTR2 signifikantně vyšší než SSTR3 a SSTR5. Stejně tak SSTR3 byl exprimován více než SSTR5 (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks,  $P < 0,001$ ). Expres SSTR v jednotlivých typech klinicky afunkčních adenomů dle imunohistochemického profilu je znázorněna v grafech č. 6–8. Míra exprese SSTR5 byla vyšší u tichých kortikotropních adenomů. Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy a ostatními typy KAA byl statisticky významný při použití Mann-Whitneyova testu ( $p = 0,044$ ). Nebyl nalezen rozdíl v expresi SSTR2 a SSTR3 s ohledem na jednotlivé imunohistochemické typy. Nebyla nalezena korelace exprese mRNA pro žádný z SSTR a D2R. Korelovala mezi sebou exprese SSTR2 a 3 – Pearsonova korelace, korelační koeficient 0,956,  $P < 0,05$ .

**Graf 5 Počty klinicky afunkčních adenomů rozdělené do skupin dle míry relativní exprese mRNA somatostatinových receptorů 2,3 a 5.**

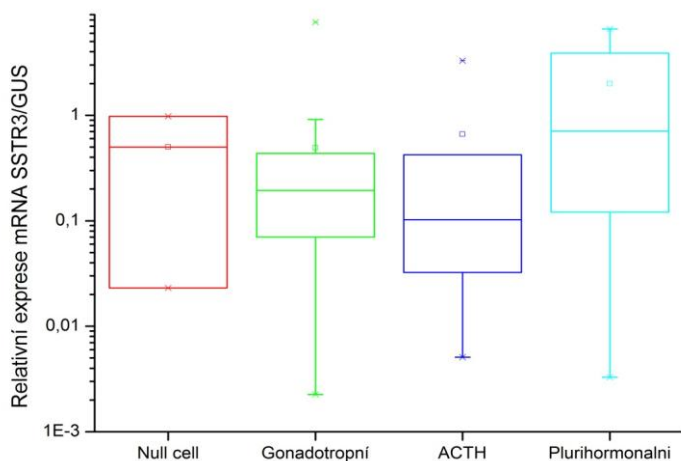


Při rozdělení adenomů dle míry exprese mRNA SSTR2, 3 a 5 je patrná velmi nízká exprese SSTR5. Expres SSTR2 převyšovala nad SSTR3 a dosahovala vyšších hodnot.

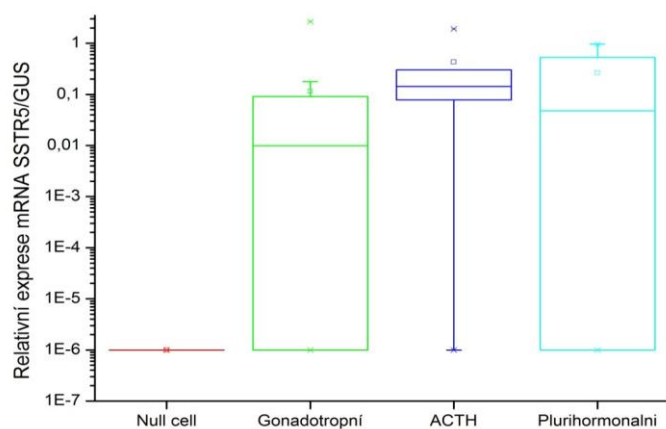
**Graf 6-8 shora dolů Relativní exprese mRNA SSTR2, 3 a 5 normalizovaná vůči GUS v jednotlivých typech KAA rozdělených dle imunohistochemické pozitivity hormonů**



Při hodnocení míry exprese mRNA somatostatinového receptoru 2 nebyl mezi jednotlivými imunohistochemickými podtypy nalezen statisticky významný rozdíl.



Při hodnocení míry exprese mRNA somatostatinového receptoru 3 nebyl mezi jednotlivými imunohistochemickými podtypy nalezen statisticky významný rozdíl.



Rozdíl mezi tichými kortikotropními adenomy v míře exprese SSTR5 a ostatními typy byl statisticky významný ( $p=0.044$ ).

## 6.5 Porovnání exprese D2R a SSTR 2, 3 a 5

Klinicky afunkční adenomy bez rozdílu dle imunohistochemie:

Při porovnání dopaminového D2 receptoru (medián relativní exprese 0,99) a SSTR2 (medián relativní exprese 0,55), ve všech adenomech, bez rozdílu imunohistochemie, nebyl nalezen signifikantní rozdíl v míře exprese. Naopak byla nalezena signifikantně vyšší míra exprese mRNA pro D2R oproti SSTR3 (medián relativní exprese 0,19) a SSTR 5 (medián relativní exprese 0,02), (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks,  $P < 0,001$ ).

Gonadotropní adenomy:

Při rozdělení dle imunohistochemického profilu, byla exprese mRNA pro D2R u gonadotropních adenomů (medián relativní exprese 1,3) statisticky významně vyšší než SSTR2 (medián relativní exprese 0,49;  $P < 0,01$ ), stejně tak pro SSTR3 (medián relativní exprese 0,19;  $P < 0,001$ ) a SSTR5 (medián relativní exprese 0,01;  $P < 0,001$ ).

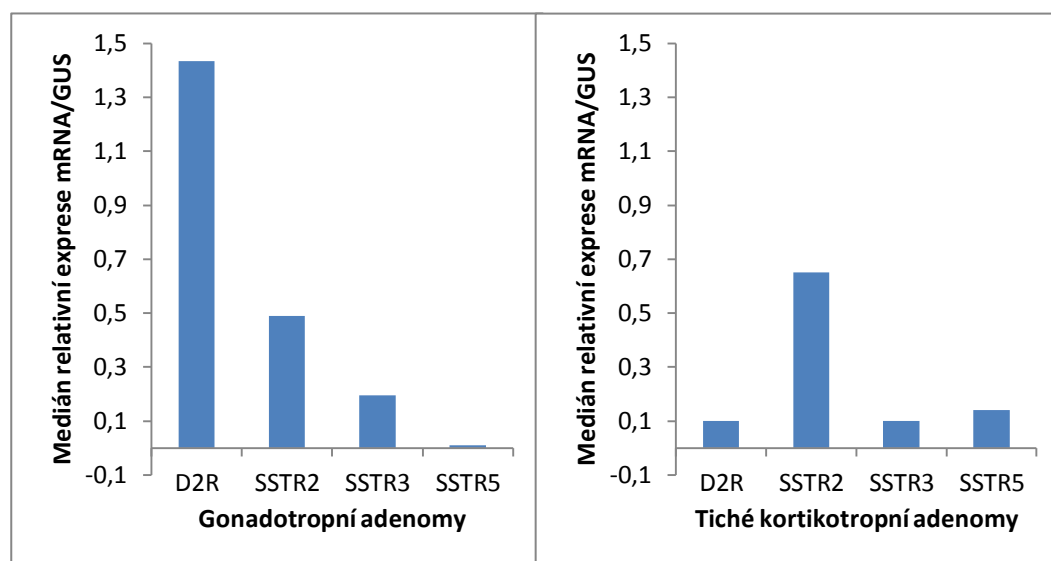
Tiché kortikotropní adenomy:

Míra exprese u kortikotropních adenomů byla signifikantně nižší pro D2R (medián relativní exprese 0,01) než pro SSTR2 (medián relativní exprese 0,65,  $P = 0,015$ ). Statisticky významný rozdíl nebyl mezi expresí D2R a SSTR3 a 5, ani SSTR2 a 5.

Adenomy bez imunohistochemické pozitivivity a plurihormonální adenomy:

Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi mírou exprese D2R a SSTR 2, 3 a 5 v null-cell a plurihormonálních adenomech.

**Graf 9** Exprese D2R a SSTR 2, 3 a 5 v gonadotropních a tichých kortikotropních adenomech



Vlevo je patrná signifikantně vyšší míra exprese mRNA D2R než somatostatinových receptorů, stejně tak byli přítomny statisticky významné rozdíly mezi mírou exprese jednotlivých SSTR. Vpravo je znázorněna míra exprese v tichých kortikotropních adenomech, kde statisticky významný rozdíl byl mezi mírou exprese SSTR2 a D2R.

## 7 Diskuse

Klinicky afunkční adenomy se neprojevují příznaky z hormonální nadprodukce, přesto lze u nich produkci hormonů prokázat. Imunohistochemické vyšetření prokázalo pozitivitu pro gonadotropní hormony LH a FSH v 76 % vyšetřovaných adenomů. To je více než byla frekvence výskytu gonadotropních adenomů nalezená ve velké sérii adenomů v německém registru.<sup>6</sup> Rozdíl by mohlo vysvětlit to, že v naší studii nebylo prováděno vyšetření elektronovým mikroskopem. Lehká glykoproteinová pozitivita v méně než 10 % buněk může být pozorována i u null-cell adenomů. Ve skutečnosti, většina onkocytomů a null-cell adenomů patří do skupiny gonadotropních adenomů, neboť exprimují steroidogenní faktor 1 a transkripční faktor, které jsou specifické pro gonadotropní linii.<sup>7</sup> Zastoupení tichých kortikotropních a plurihormonálních adenomů bylo ve shodě s prací Osamury.<sup>8</sup> Rovněž věk a pohlaví operovaných pacientů byly ve shodě s daty již publikovanými na větším souboru.<sup>9</sup>

V normální hypofýze D2R zprostředkovává inhibici sekrece prolaktinu působením dopaminu.<sup>10</sup> Léky působící na D2R jsou pak u prolaktinomů schopny zmenšit jejich velikost a kontrolovat nadměrnou sekreci prolaktinu. Studie hodnotící přítomnost D2R pomocí *in-situ* hybridizace a scintigrafie prokázaly přítomnost míst vázících dopamin u KAA.<sup>11, 12</sup> V posledních letech je pak více používána RT-PCR ke kvantifikaci exprese mRNA pro rozdílné typy dopaminových receptorů. Pivonello a kol. našel expresi D2R ve 12 z 18 hodnocených KAA (67 %) s predominancí dlouhé isoformy D2R.<sup>13</sup> V naší práci jsme pozorovali expresi D2R ve všech hodnocených KAA. Ve shodě s našimi výsledky jsou i další nedávné práce<sup>1, 14</sup> včetně práce Su a kol.<sup>15</sup>

Cílem naší práce bylo korelovat výsledky exprese mRNA D2R s jednotlivými typy adenomu dle imunohistopatologie založené na imunohistochemickém průkazu jednotlivých hypofyzárních hormonů. Renner a kol. publikoval v roce 1998 práci s KAA od 18 pacientů, kde téměř všechny gonadotropin-immunopozitivní adenomové buňky exprimovaly mRNA pro D2R. Šlo o práci hodnotící přítomnost D2R pomocí *in situ* hybridizace.<sup>16</sup> Očekávali jsme tedy vyšší expresi mRNA pro D2R u adenomů vysoce pozitivních na LH, FSH a jejich  $\alpha$ -podjednotku. Ačkoli jde v současné době v našem případě o největší soubor nemocných publikovaný v literatuře (78 hodnocených KAA, 63 gonadotropinomů), nenalezli jsme žádný statisticky signifikantní vztah mezi kvantitativní expresí mRNA D2R a imunohistochemickou pozitivitou gonadotropních hormonů. Velmi nízká exprese mRNA D2R byla u všech tichých kortikotropních adenomů. Tento výsledek potvrzuje výsledky své práce Tateny a kol.<sup>17</sup> Rovněž Su ve své práci na 51 KAA prokázal nižší expresi mRNA D2R u tichých kortikotropů, ta však nebyla statisticky významná.<sup>15</sup>

Nobels a kol. poukázal na skupinu KAA s významnou hypersekrecí gonadotropinů nebo jejich podjednotky. Tato skupina by mohla lépe odpovídat na léčbu dopaminovými agonisty.<sup>18</sup> Konzervativní léčba KAA dopaminovými agonisty je však stále experimentální. Souhrnné práce ukazují kumulativní zmenšení tumoru ve 27,6 % a míru růstu rezidua v 8,5 %.<sup>19</sup> Dle některých autorů může být pooperační léčba prevencí růstu reziduálního tumoru. Ve své práci Greenman a kol. léčila pooperačně 33 KAA dopaminovými agonisty. U 11 reziduálních tumorů došlo ke zmenšení po léčbě. Bohužel tato studie nehodnotila expresi D2R.<sup>20</sup> Efekt dopaminových agonistů závisí na kvantitě jejich exprese s tím, že krátká varianta se svými vlastnostmi je predispozicí pro lepší výsledek.<sup>13</sup> Na podkladě výsledků naší práce lze říci, že přítomnost D2R může být předpokládána na základě imunohistopatologické klasifikace adenomů pouze u tichých kortikotropních adenomů. U nich byla exprese velmi nízká. Plurihormonální tumory, které bývají obvykle velké a agresivně rostoucí, měly rovněž statisticky významně nižší expresi. Většina KAA jsou však gonadotropinomy a null-cell adenomy. U nich nelze z exprese glykoproteinových hormonů predikovat míru exprese D2R a odpověď na léčbu. Současně velmi heterogenní míra exprese D2R může být vysvětlením pro

rozporuplné výsledky dosavadních experimentů s léčbou dopaminovými agonisty. Stejně tak práce Su stanovující expresi mRNA D2R pomocí kvantitativní real-time RT-PCR prokázala o mnoho nižší míru exprese mRNA D2R u klinicky afunkčních adenomů oproti prolaktinomům. Stejně tak byla exprese D2R 4krát nižší u rezistentních prolaktinomů oproti prolaktinomům s dobrou odpovědí na léčbu DA.<sup>15</sup> Limitací práce, stejně jako v našem případě, může být fakt, že byla měřena pouze exprese mRNA D2R. Na kortikotropních hypofyzárních adenomech však de Bruin prokázal, že exprese mRNA D2R velmi dobře korelovala s expresí D2R proteinu.<sup>21</sup>

U KAA hodnotil pomocí real-time RT-PCR expresi SSTR Taboada u 19 KAA a u 9 gonadotropních hormonů pak Saveanu. V obou případech byla nejvyšší exprese SSTR3 a v menší míře SSTR2. SSTR5 nebyl přítomen nebo byla jeho exprese nízká.<sup>3, 33</sup> Stejných výsledků dosáhl i Tateno u 15 KAA a Saveanu a kol u 58 KAA.<sup>17, 34</sup> V naší práci byla exprese SSTR2 a SSTR3 přítomna u všech adenomů. V absolutní i relativní kvantifikaci dominovala na prvním místě exprese SSTR2 následovaná expresí mRNA pro SSTR3. Jak pro všechny KAA dohromady, tak pro jednotlivé podtypy dle imunohistochemického profilu. Zde se naše výsledky liší od předchozích. Ve shodě je naopak nízká nebo nepřítomná exprese SSTR 5. Exprese SSTR3 a SSTR2 se v jednotlivých imunohistochemických profilech nelišila. U tichých kortikotropních adenomů však byla míra exprese SSTR5 signifikantně vyšší. Vysokou expresi SSTR5 lze nalézt u kortikotropních adenomů, kde dominuje SSTR5 a kde je naopak velmi nízká míra exprese SSTR2 jak na 30 kortikotropních adenomech prokázal pomocí real-time RT PCR de Bruin.<sup>21</sup> Obdobných výsledků u 12 ACTH produkujících adenomů dosáhl i Tateno, který současně hodnotil expresi i u 8 tichých kortikotropních adenomů a 15 KAA.<sup>17</sup> Ve shodě s naší prací je míra exprese SSTR2 oproti SSTR5 u silentních kortikotropních adenomů vyšší. Exprese SSTR5 však, na rozdíl od našich dat, byla nižší než u ostatních KAA. Jedním z vysvětlení by mohla být při velmi heterogenní míře exprese u všech somatostatिनových receptorů především velikost vyšetřovaného souboru.

Užití somatostatिनových analog k léčbě KAA shrnula ve své práci Colao.<sup>19</sup> K redukci tumorózní masy u KAA při použití octreotidu dochází pouze ve 12 %<sup>19</sup>. Růst tumoru nelze zcela přesně hodnotit vzhledem k velmi krátké době sledování u publikovaných prací, ale docházelo k němu asi v 5 %. Lze předpokládat ovšem hodnotu vyšší. Octreotid je somatostatिनové analogum s preferenční afinitou k SSTR2 a o řád nižší afinitou k SSTR5. Vzhledem k převaze SSTR3 v KAA je možné, že další analog pasireotid s vazbou na SSTR1-3 a SSTR5 by mohl mít větší efekt. Jeho největší afinita je však k SSTR5, což při současných znalostech o somatostatिनových receptorech a jejich expresi nedává moc velké naděje. Ne moc dobře také dopadlo klinické zkoušení pasireotidu u nemocných s Cushingovým syndromem, kdy pasireotid v monoterapii byl účinný jen u 5 ze 17 (29 %) nemocných.<sup>35</sup>

Koexpresi somatostatिनových a dopaminových receptorů zatím hodnotilo málo autorů. U většiny GH produkujících adenomů byla prokázána koexprese D2R, SSTR2 a SSTR5. Současně byla větší exprese D2R oproti SSTR.<sup>1, 36</sup> U prolaktinomů pak byla exprese mRNA D2R 42–84 násobně větší než SSTR.<sup>37</sup> Stejně tak u kortikotropních adenomů byla prokázána koexprese D2R a SSTR5 v 60 % a D2R a SSTR2 ve 30 % vyšetřovaných adenomů.<sup>21</sup> Navíc exprese D2R byla vyšší u tichých kortikotropních adenomů v porovnání s kortikotropními adenomy.<sup>17</sup> U KAA byla rovněž prokázána koexprese D2R, SSTR3 a SSTR2, s mírou exprese klesající ve stejném pořadí. U 14 KAA hodnotil koexpresi Neto. Přestože byla přítomna korelace mezi D2R a SSTR2, dlouhou isoformou D2R a SSTR2 i 5 v normální hypofýze, nenalezl korelaci ani u somatotropních adenomů ani u KAA.<sup>1</sup> Ani my jsme v naší práci neprokázali korelaci D2R a SSTR. Nepublikovaná data od 58 KAA uvádí Saveanu, kdy rovněž dominovala exprese D2R (medián relativní exprese 3,7) oproti SSTR3 (1,2) a SSTR2 (0,3).<sup>34</sup> V buněčných kulturách izolovaných z 38 KAA pak hodnotil expresi D2R a SSTR Florio. Opět převažovala relativní exprese D2R (2,9) nad SSTR3 (0,6) a SSTR2 (0,3).



Expresie byla velmi variabilní a některé buňky neexprimovaly vůbec.<sup>38</sup> Naše data jsou jen částečně ve shodě s předchozími pracemi. Míra exprese byla ve všech případech velmi variabilní. Stejně tak exprese D2R dominovala nad expresí somatostatinových receptorů u gonadotropních adenomů, které tvořili většinu z našeho souboru nemocných s KAA. Nicméně v naší práci byla odlišná míra exprese SSTR3, který byl exprimován méně než SSTR2. Bohužel ani jedna z prací nehodnotila expresi s ohledem na imunohistochemické charakteristiky jednotlivých KAA. Neboť v porovnání s gonadotropními adenomy v ostatních podtypech klesala exprese v pořadí SSTR2 >> D2R >> SSTR3 u null-cell adenomů, SSTR2 >> SSTR3 >> D2R >> SSTR5 u plurihormonálních a SSTR2 >> SSTR 5 >> D2R a SSTR3. Počty ostatních podtypů mimo gonadotropní adenomy jsou však poměrně malé k vyvozování konečných závěrů. Parciálně odlišná data si vysvětlujeme jak typem adenomů vzatých do analýzy, malým počtem nemocných v práci (např. práce Neta) anebo použitím buněčných kultur místo tkáně adenomu.

V naší práci jsme prokázali velmi heterogenní expresi dopaminového D2 receptoru a somatostatinových receptorů 2 a 3. Současně se znalostí těchto dat se otevírají dveře testování nových chimérických molekul i u klinicky afunkčních adenomů. Dopastatiny BIM-23A387 nebo BIM-23A370, které jsou mířeny proti SSTR2 a D2R ukázaly, při samostatném použití, schopnost snížit sekreci GH a prolaktinu u hypofyzárních tumorů ve srovnání se současnými SSA a DA.<sup>36, 39</sup> Pro KAA je k dispozici zatím stále málo dat, relevantní klinická data nejsou. Klinická studie s dopastatinem BIM23A760 byla ukončena pro hlavně dopaminergní efekt a z něj plynoucí nežádoucí účinky. Dosavadní dopastatiny zaměřené především proti SSTR2,5 a D2R neinhibují buněčné linie o mnoho více než dopaminový agonisté samotní. Dosud však nebyla plně odhalena role SSTR3 receptoru, který je v KAA exprimován nejvíce. Dopastatiny cíleně ovlivňující i SSTR3, proto mohou přinést nové možnosti. V budoucnu bude jistě vhodné stanovení exprese všech podtypů, včetně jednotlivých variant. Léčba by pak měla být volena s ohledem na profil exprese somatostatinových a dopaminových receptorů. Nezbytná bude korelace těchto dat s léčebnou odpovědí. U neuroendokrinních tumorů se například zabývali stanovením somatostatinových receptorů jako markerů pro predikci chování tumoru kolegové z Brna. Nepozorovali sice prediktivní význam exprese SSTR2 ani SSTR5, ale statisticky významný byl čas do progresu a radiologická odpověď u nemocných s nízkou až nulovou hladinou exprese mRNA pro SSTR4. Způsob, jakým k tomu dochází, je nejasný. Slabý a kol. se domnívají, že možným mechanismem je heterodimerizace SSTR4 s SSTR2 anebo SSTR5 a s tím související blokáda účinku somatostatinových analog.<sup>40</sup>

Standardním přístupem v léčbě KAA je v současné době transsfenoidální adenektomie. Pooperační přístup k nemocnému s reziduálním tumorem zůstává předmětem diskuzí. Dosud nejsou žádné evidence-based indikace jak pro „watch and wait“ tak pro radioterapii Lekselovým gamanožem či medikamentózní léčbu.<sup>41</sup> Naše práce podporuje nutnost dalších prospektivních kontrolovaných studií zaměřených na zhodnocení léčby současnými i nově vyvíjenými agonisty ve vztahu k expresi jednotlivých typů receptorů.

## 8 Závěry

- V naší práci jsme u 78 nemocných provedli zhodnocení kvantitativní míry exprese mRNA pro dopaminový receptor 2 s korelací dle jednotlivých imunohistopatologických charakteristik klinicky afunkčních adenomů. Míra exprese byla velmi heterogenní.
- Signifikantně byla exprese dopaminového D2 receptoru velmi nízká v silentních kortikotropních adenomech a signifikantně nižší v plurihormonálních tumorech. Imunohistochemická pozitivita gonadotropinů nepředpovídá kvantitu D2R.
- SSTR5 je v silentních kortikotropních adenomech exprimován více, naopak exprese SSTR2 a 3 se dle histologického typu neliší.
- Nebyla nalezena korelace mezi expresí žádného ze somatostatinových receptorů 2, 3 a 5 s dopaminovým D2 receptorem. Korelovala mezi sebou exprese SSTR2 a 3.
- Současně jsme prokázali koexpresi D2R a somatostatinových receptorů u KAA s predominantní expresí D2R nad SSTR2 a 3 u gonadotropních adenomů.
- Velmi heterogenní exprese dopaminových i somatostatinových receptorů může být důvodem proč experimentální použití analog těchto receptorů event. dopaminů není klinicky efektivní u většiny klinicky afunkčních adenomů. Je však potřeba dalších prospektivních kontrolovaných studií s korelací léčebné odpovědi vzhledem k profilu exprese receptorů.

## 9 Použitá literatura

1. NETO, L. V., MACHADO EDE, O., LUQUE, R. M., TABOADA, G. F., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., QUINTELLA, L. P., NIEMEYER, P., JR., DE CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D. & GADELHA, M. R. Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 1931-1937.
2. PATEL, Y. C. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999 **20** 157-198.
3. TABOADA, G. F., LUQUE, R. M., BASTOS, W., GUIMARAES, R. F., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., FONTES, R., MATA, P. J., FILHO, P. N., CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D. & GADELHA, M. R. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007 **156** 65-74.
4. CAP, J., CERMÁN, J., NEMEČEK, S., MAREKOVÁ, M., HANA, V. & FRYSAK, Z. The influence of treatment with somatostatin analogues on morphology, proliferative and apoptotic activity in GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Neurosci* 2003 **10** 444-448.
5. O'TOOLE, D., SAVEANU, A., COUVELARD, A., GUNZ, G., ENJALBERT, A., JAQUET, P., RUSZNIEWSKI, P. & BARLIER, A. The analysis of quantitative expression of somatostatin and dopamine receptors in gastro-entero-pancreatic tumours opens new therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol* 2006 **155** 849-857.
6. SAEGER, W., LUDECKE, D. K., BUCHFELDER, M., FAHLBUSCH, R., QUABBE, H. J. & PETERSENN, S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol* 2007 **156** 203-216.
7. AL-SHRAIM, M. & ASA, S. L. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: what is new? *Acta Neuropathol* 2006 **111** 1-7.
8. OSAMURA, R. Y., KAJIYA, H., TAKEI, M., EGASHIRA, N., TOBITA, M., TAKEKOSHI, S. & TERAMOTO, A. Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol* 2008 **130** 495-507.
9. MINDERMANN, T. & WILSON, C. B. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994 **41** 359-364.
10. LAMBERTS, S. W. & MACLEOD, R. M. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 1990 **70** 279-318.
11. BEVAN, J. S. & BURKE, C. W. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986 **25** 561-572.
12. FERONE, D., LASTORIA, S., COLAO, A., VARRELLA, P., CERBONE, G., ACAMPA, W., MEROLA, B., SALVATORE, M. & LOMBARDI, G. Correlation of scintigraphic results using <sup>123</sup>I-methoxybenzamide with hormone levels and tumor size response to quinagolide in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 248-252.
13. PIVONELLO, R., MATRONE, C., FILIPPELLA, M., CAVALLO, L. M., DI SOMMA, C., CAPPABIANCA, P., COLAO, A., ANNUNZIATO, L. & LOMBARDI, G. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison

- with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** 1674-1683.
14. NISHIOKA, H., TAMURA, K., IIDA, H., KITSUKAKE, M., ENDO, A., IKEDA, Y. & HARAOKA, J. Co-expression of somatostatin receptor subtypes and estrogen receptor-alpha mRNAs by non-functioning pituitary adenomas in young patients. *Mol Cell Endocrinol* 2011 **331** 73-78.
  15. SU, Z., WANG, C., WU, J., JIANG, X., CHEN, Y., ZHENG, W., ZHUGE, Q., WU, Z. & ZENG, Y. Expression of dopamine 2 receptor subtype mRNA in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurol Sci* 2011.
  16. RENNER, U., ARZBERGER, T., PAGOTTO, U., LEIMGRUBER, S., UHL, E., MULLER, A., LANGE, M., WEINDL, A. & STALLA, G. K. Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 1368-1375.
  17. TATENO, T., KATO, M., TANI, Y., OYAMA, K., YAMADA, S. & HIRATA, Y. Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas. *Endocr J* 2009 **56** 579-584.
  18. NOBELS, F. R., DE HERDER, W. W., VAN DEN BRINK, W. M., KWEKKEBOOM, D. J., HOFLAND, L. J., ZUYDERWIJK, J., DE JONG, F. H. & LAMBERTS, S. W. Long-term treatment with the dopamine agonist quinagolide of patients with clinically non-functioning pituitary adenoma. *Eur J Endocrinol* 2000 **143** 615-621.
  19. COLAO, A., DI SOMMA, C., PIVONELLO, R., FAGGIANO, A., LOMBARDI, G. & SAVASTANO, S. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2008 **15** 905-915.
  20. GREENMAN, Y., TORDJMAN, K., OSHER, E., VESHCHEV, I., SHENKERMANN, G., REIDER, GROSWASSER, II, SEGEV, Y., OUAKNINE, G. & STERN, N. Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005 **63** 39-44.
  21. DE BRUIN, C., PEREIRA, A. M., FEELDERS, R. A., ROMIJN, J. A., ROELFSEMA, F., SPRIJ-MOOIJ, D. M., VAN AKEN, M. O., VAN DER LELIJ, A. J., DE HERDER, W. W., LAMBERTS, S. W. & HOFLAND, L. J. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 **94** 1118-1124.
  22. WANG, F., FLANAGAN, J., SU, N., WANG, L. C., BUI, S., NIELSON, A., WU, X., VO, H. T., MA, X. J. & LUO, Y. RNAscope A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *J Mol Diagn* 2012 **14** 22-29.
  23. STROWSKI, M. Z. & BLAKE, A. D. Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 2008 **286** 169-179.
  24. JAQUET, P., SAVEANU, A., GUNZ, G., FINA, F., ZAMORA, A. J., GRINO, M., CULLER, M. D., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A. & OUAFIK, L. H. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 781-792.
  25. FREDA, P. U., KATZNELSON, L., VAN DER LELY, A. J., REYES, C. M., ZHAO, S. & RABINOWITZ, D. Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 **90** 4465-4473.
  26. CAP, J., MAREKOVA, M., CERMAN, J., MALIROVA, E., SUBA, P., NETUKA, D., HANA, V. & MAREK, J. Inhibition of hormone secretion in GH-secreting pituitary adenomas by receptor-subtype specific somatostatin analogues in vitro. *Gen Physiol Biophys* 2003 **22** 201-212.

27. SHIMON, I., YAN, X., TAYLOR, J. E., WEISS, M. H., CULLER, M. D. & MELMED, S. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *J Clin Invest* 1997 **100** 2386-2392.
28. CAP, J., NEMECEK, S., REZACOVA, M. & CERMAN, J. Možnosti medikamentózní léčby akromegalie. *Cas Lek Cesk* 2005 **144** 33-37.
29. FERONE, D., DE HERDER, W. W., PIVONELLO, R., KROS, J. M., VAN KOETSVELD, P. M., DE JONG, T., MINUTO, F., COLAO, A., LAMBERTS, S. W. & HOFLAND, L. J. Correlation of in vitro and in vivo somatotrophic adenoma responsiveness to somatostatin analogs and dopamine agonists with immunohistochemical evaluation of somatostatin and dopamine receptors and electron microscopy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 **93** 1412-1417.
30. CASARINI, A. P., JALLAD, R. S., PINTO, E. M., SOARES, I. C., NONOGAKI, S., GIANNELLA-NETO, D., MUSOLINO, N. R., ALVES, V. A. & BRONSTEIN, M. D. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary* 2009 **12** 297-303.
31. TABOADA, G. F., LUQUE, R. M., NETO, L. V., MACHADO EDE, O., SBAFFI, B. C., DOMINGUES, R. C., MARCONDES, J. B., CHIMELLI, L. M., FONTES, R., NIEMEYER, P., DE CARVALHO, D. P., KINEMAN, R. D. & GADELHA, M. R. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol* 2008 **158** 295-303.
32. SAVEANU, A., GUNZ, G., DUFOUR, H., CARON, P., FINA, F., OUAFIK, L., CULLER, M. D., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A. & JAQUET, P. Bim-23244, a somatostatin receptor subtype 2- and 5-selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86** 140-145.
33. SAVEANU, A., MORANGE-RAMOS, I., GUNZ, G., DUFOUR, H., ENJALBERT, A. & JAQUET, P. A luteinizing hormone-, alpha-subunit- and prolactin-secreting pituitary adenoma responsive to somatostatin analogs: in vivo and in vitro studies. *Eur J Endocrinol* 2001 **145** 35-41.
34. SAVEANU, A. & JAQUET, P. Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas. *Rev Endocr Metab Disord* 2009 **10** 83-90.
35. FEELDERS, R. A., DE BRUIN, C., PEREIRA, A. M., ROMIJN, J. A., NETEA-MAIER, R. T., HERMUS, A. R., ZELISSEN, P. M., VAN HEEREBEEK, R., DE JONG, F. H., VAN DER LELY, A. J., DE HERDER, W. W., HOFLAND, L. J. & LAMBERTS, S. W. Pasireotide alone or with cabergoline and ketoconazole in Cushing's disease. *N Engl J Med* 2010 **362** 1846-1848.
36. SAVEANU, A., LAVAQUE, E., GUNZ, G., BARLIER, A., KIM, S., TAYLOR, J. E., CULLER, M. D., ENJALBERT, A. & JAQUET, P. Demonstration of enhanced potency of a chimeric somatostatin-dopamine molecule, BIM-23A387, in suppressing growth hormone and prolactin secretion from human pituitary somatotroph adenoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 **87** 5545-5552.
37. FUSCO, A., GUNZ, G., JAQUET, P., DUFOUR, H., GERMANETTI, A. L., CULLER, M. D., BARLIER, A. & SAVEANU, A. Somatostatinergic ligands in dopamine-sensitive and -resistant prolactinomas. *Eur J Endocrinol* 2008 **158** 595-603.
38. FLORIO, T., BARBIERI, F., SPAZIANTE, R., ZONA, G., HOFLAND, L. J., VAN KOETSVELD, P. M., FEELDERS, R. A., STALLA, G. K., THEODOROPOULOU, M., CULLER, M. D., DONG, J., TAYLOR, J. E., MOREAU, J. P., SAVEANU, A., GUNZ, G., DUFOUR, H. & JAQUET, P. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule,

- BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocr Relat Cancer* 2008 **15** 583-596.
39. JAQUET, P., GUNZ, G., SAVEANU, A., DUFOUR, H., TAYLOR, J., DONG, J., KIM, S., MOREAU, J. P., ENJALBERT, A. & CULLER, M. D. Efficacy of chimeric molecules directed towards multiple somatostatin and dopamine receptors on inhibition of GH and prolactin secretion from GH-secreting pituitary adenomas classified as partially responsive to somatostatin analog therapy. *Eur J Endocrinol* 2005 **153** 135-141.
  40. SLABY, O., SACHLOVA, M., BEDNARIKOVA, M., FABIAN, P., SVOBODA, M., VYTOPILOVA, S., VALIK, D. & VYZULA, R. Gene expression of somatostatin receptor 4 predicts clinical outcome of patients with metastatic neuroendocrine tumors treated with somatostatin analogs. *Cancer Biother Radiopharm* 2010 **25** 237-243.
  41. SALMAGGI, A. & LODRINI, S. Commentary on "Expression of dopamine 2 receptor subtypes mRNA in clinically nonfunctioning pituitary adenomas". *Neurol Sci* 2011.

## 10 Přehled publikační činnosti autora

### *Monografie a kapitoly v monografiích*

Autor zatím žádnou monografii ani kapitolu v monografii do tisku neodeslal.

### *Původní články v časopise s impakt faktorem*

**Gabalec F**, Cap J, Ryska A, Vasatko T & Ceeova V. Benign fine-needle aspiration cytology of thyroid nodule: to repeat or not to repeat? Eur J Endocrinol 2009 161 933–937. **IF 3,791**

**Gabalec F**, Beranek M, Netuka D, Masopust V, Nahlovsky J, Cesak T, Marek J & Cap J. Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas. Pituitary 2011. **IF 2,021**

### *Původní články*

**Gabalec F** & Horáček J. Insulinoma – the presentation of two cases and their diagnostics. Lékařské zprávy 2007 52 215–219.

**Gabalec F**, Zavrelova A, Havel E, Cerman JJ, Radocha J, Sviliás I & Cap J. Pneumocystis pneumonia during medicamentous treatment of Cushing's syndrome – a description of two cases. Acta Medica (Hradec Králové) 2011 54 127 – 130.

### *Přehledové články*

**Gabalec F** & Cap J. Clinically non-functioning pituitary adenomas – possibilities of medical treatment. DMEV 2009 12 94–98.

### *Abstrakta v časopisech s impakt faktorem a v mezinárodních sbornících*

**Gabalec F** & Cap J. Hypofysární adenom s nadprodukcí TSH. In IV: Hradecký postgraduální kurz v endokrinologii, pp 83–84. Ed J Cap. Hradec Králové: Nucleus HK, 2008.

**Gabalec F**, Ceeova V, Cap J, Vasatko T & Ryska A. Má opakování tenko-jehlové aspirační cytologie význam? In XXXI. Endokrinologické dni, p 38. Štrbské pleso, Slovakia, 2008.

**Gabalec F**, Beranek M, Cap J, Netuka D, Masopust V & Nahlovsky J. Kvantitativní analýza D2 dopaminového receptoru v klinicky afunkčních nádorech hypofýzy. In XXXII. Endokrinologické dny, p 98. Český Krumlov: Galén, 2009.

**Gabalec F**, Čáp J & Beránek M. Quantitative dopaminergic receptors expression in clinically non-functioning pituitary tumours by real-time PCR. Acta Medica (Hradec Králové) 2009 52 37–38.

Cap J, Cerman J, **Gabalec F**, Beranek M & Nemecek S. Expresse hormonů a receptorů v adenomech hypofýzy – podklad pro cílenou léčbu recidivy? In XXXIII. Endokrinologické dni. Košice, Slovakia, 2010.

**Gabalec F**, Beranek M, Netuka D, Masopust V, Cesak T, Nahlovsky J & Cap J. Kvantitativní analýza D2 dopaminového receptoru v klinicky afunkčních nádorech hypofýzy. In XXXIII. endokrinologické dni. Košice, Slovakia, 2010.

Svilias I, **Gabalec F**, Horacek J, Netuka D & Cap J. TSH produkující adenomy hypofýzy – popis čtyř případů. In XXXIII. Endokrinologické dni. Košice, Slovakia, 2010.

**Gabalec F**, Cap J, Beranek M, Netuka D, Masopust V & Nahlovsky J. Quantitative analysis of dopamine D2 receptor expression in clinically non-functioning adenomas. In Endocrine Journal - 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010). Ed I Kojima. Kyoto, Japan: Endocrine Journal, 2010. **IF 1,952**

**Gabalec F**, Cap J, Havel E, Zavrelouva A, Radocha J & Cerman JJ. Pneumocystis pneumonia during conservative treatment of Cushing's syndrom: description of two cases. In Endocrine Abstracts – 12th European Congress of Endocrinology. Prague, Czech Republic: BioScientifica, 2010.

**Gabalec F**, Čáp J, Beránek M, Netuka D, Masopust V, Náhlovský J & Česák T. Quantitative dopaminergic receptors expression in clinically non-functioning pituitary tumours by real-time PCR. Acta Medica (Hradec Králové) 2010 53 46–46.

Feketeova L, Ondrikova M, Janega P, **Gabalec F**, Ryska A, Pastorekova S & Babal P. Relation of carbonic anhydrase IX and vascularization and its influence on biological behavior of medullary thyroid carcinoma. Virchows Archiv 2011 459 S217-S217. **IF 2,336**

**Gabalec F**, Beranek M, Drastikova M, Cesak T, Netuka D, Masopust V, Marek J & Cap J. Somatostatin Receptors and Dopamine 2 Receptor Expression in Various Pathological Types of Clinically Non-Functioning Pituitary Adenomas. Endocrine Reviews 2011 32 P1-406. **IF 22,469**

**Gabalec F**, Drastikova M, Beranek M, Netuka D, Masopust V, Cesak T, Machac J, Marek J & Cap J. Somatostatinové receptory v klinicky afunkčních nádorech hypofýzy. DMEV 2011 14, Suppl 2 46–47.

Husek P, Pacovský J, **Gabalec F**, Kosina J & Brodak M. Oboustranná adrenalektomie: život zachraňující výkon u pacientů s Cushingovým syndromem při ektopické sekreci ACTH – kazuistiky. Ces Urol 2011 15 (Suppl 2) 50.

#### ***Přednášky na odborných setkáních, které přednesl autor***

**Gabalec F.**, Čáp J. TSH secreting pituitary adenoma. IV. Hradecké postgraduální dny v endokrinologii – Hradec Králové. 2008

**Gabalec F**, Ceeová V, Vašátko T, Ryška A, Čáp J Má opakování tenko-jehlové cytologie smysl? XXXI. Endokrinologické dni – Štrbské pleso 2008

**Gabalec F**. Péče o pacienta po tyreoidektomii. Vybraná problematika v praktickém lékařství. Hradec Králové. 17. 2. 2010

**Gabalec F**. Ectopic Cushing's syndrome with severe Pneumocystis Pneumonia, 19. 5. 2010 at Pituitary explorer educational programme, Klampenborg, Denmark

**Gabalec F**. Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas. 7. fakultní konference studentů doktorského studia 17. 10. 2011

**Gabalec F**. Klinické aspekty hypothalamo-hypofyzární nadledvinové osy pohledem endokrinologa. 4.2.2012 Pracovní setkání lektorů interaktivních dispenzačních seminářů. Farmaceutická fakulta UK.

**Gabalec F**. Polékové tyreopatie. 4.2.2012 Pracovní setkání lektorů interaktivních dispenzačních seminářů. Farmaceutická fakulta UK. Farmaceutická fakulta UK.